

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-137559

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)6月20日

G 01 N 27/30
27/46J-7363-2G
A-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 昭60-278202

⑰ 出 願 昭60(1985)12月11日

⑱ 発 明 者	河 栗 真 理 子	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	南 海 史 朗	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	飯 島 孝 志	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑳ 出 願 人	松下電器産業株式会社	門真市大字門真1006番地	
㉑ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

(1) 絶縁性の基板に測定極、対極および参照極からなる電極系を設けた電極部の上に、空間部を介して保液層と多孔体膜からなる濾過層および酸化還元酵素と、前記酵素と共役する酸化型色素を含んだ反応層を枠体にはさんで設置し、さらにその上部に親水性の多孔体からなる試料添加層を設けたことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 試料添加層がセルロースよりなることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はバイオセンサに関し、生体試料中の特定成分を検知することが可能であり、医療分野や食品工学などに幅広く応用できるものである。

従来の技術

医療技術の進歩とともに、血液や尿中の特定成

分を測定することにより健康のチェック、病気の状態、治療の効果などがわかるようになった。しかし、従来は病院の臨床検査室で大型の機械や複雑な手法で調べているため時間や費用がかかるという問題があった。そこで、もっと簡易にその場で測定できるセンサが望まれている。その1つの試みとして第2図のような多層式の分析担体が提案されている。透明な支持体12の上に試薬層13、展開層14、防水層15、濾過層16が順に積層した構造になっている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず濾過層16により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層15にある小孔から展開層14へ均一に浸透し、試薬層13において反応が進行する。反応終了後透明な支持体12を通して矢印の方向から光をあて、分光分析により基質濃度を測定する方式である。

発明が解決しようとする問題点

この方式は微量の血液を滴下することにより、簡易に測定できるというメリットがある。しかし、

血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層15が必要となったり、反応を速めるために高温でインキュベートする必要があり、装置および担体が複雑化するという問題がある。

本発明のバイオセンサは、上記の問題点である装置や担体の複雑化をさけ、簡易な装置および担体で迅速に精度よく基質が測定できることを目的とする。

問題点を解決するための手段

本発明のバイオセンサは上記の目的を達成するため電極部の上に保液層、濾過層、反応層および試料添加層を設けたものである。

作 用

このようなセンサに血液を滴下すると試料添加層で均一にひろがり、すみやかに反応層へ供給される。反応層で酸化還元酵素および前記酵素と共役する酸化型色素がすみやかに反応する。次に濾過層において赤血球および血小板が濾過される。さらに、何も担持されていない保液層が濾過され

イセガーゼ(旭化成工業(株)製)からなる。反応層8はパルプの不織布からなり、グルコースオキシダーゼ200mgとフェリシアン化カリウム400mgをそれぞれリン緩衝液(pH 5.6)1ccに溶かした高濃度の溶液を含浸し、エタノールのような水に対する溶解度の大きい有機溶媒中に浸漬後真空乾燥してグルコースオキシダーゼおよびフェリシアン化カリウムの細かい結晶を高密度に担持している。濾過層7は孔径1μmのポリカーボネート多孔体膜で、血液中の赤血球などの固形成分を除去する。保液層6として、幅2mmの帯状のレーヨン紙を用いた。レーヨン紙の両端は枠体に固定されており、電極部の幅3.4mmの溝の内部にはまりこむような位置に保持されている。測定チップの濾過層7が、電極部の溝以外の部分によって第1図の断面Bのように支えられている。上記の試料添加層9、反応層8、濾過層7、保液層6を枠体10、11を用いて圧着またはエポキシ樹脂等の接着剤により固定している。

試料液添加層9に、血液30μlを添加し充分

な反応液をすみやかに電極部に誘導し、そこで電極反応により反応量を検知する。このように、短時間で血液サンプルが反応し、濾過されるため、簡易な装置および担体で精度よく基質の測定が可能となった。

実 施 例

以下バイオセンサの1つとして、グルコースセンサを例に具体的に説明する。

酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼを、酸化還元酵素と共役する酸化型色素としてフェリシアン化カリウムを用いた。第1図にグルコースセンサの一実施例の模式図を互いに直交した面の断面図A、Bで示す。電極部はポリ塩化ビニル樹脂からなる絶縁性の基板1に、空間部2として幅3.4mm、深さ0.15mmの溝を形成し、白金を埋めこんで、測定極3、対極4、および参照極5からなる電極系を構成した。前記電極系を覆うように枠体10および11に試料添加層9、反応層8、濾過層7、保液層6をはさんだ測定チップを設置する。試料添加層9はセルロースの織物であるハ

浸透させた後、参照極5を基準に測定極3の電圧を0~+0.1Vの間で锯齿状に0.1V/秒で変化させた。この場合、白金からなる参照極5の電位は試料液に溶解しているフェリシアン化カリウムとフェロシアン化カリウムの濃度比で決定される。添加された血液がハイセガーゼ9により全面にひろがり反応層8に供給される。血液中のグルコースが、パルプの不織布8に担持されているグルコースオキシダーゼにより酸化される際、酵素-色素共役反応によりフェリシアン化カリウムが還元され、フェロシアン化カリウムが生成する。続いて、反応した血液がポリカーボネート多孔体膜7を通過する際、赤血球などの大きな固形成分が濾過される。血液のような高粘度でかつ微量のサンプルを濾過させるのはむずかしいが、下にレーヨン紙6のような親水性の薄膜を設置することにより、すみやかに濾過できる。さらに、濾過された反応液は、帯状のレーヨン紙を均一にひろがり、その下の電極部に供給される。反応液中のフェロシアン化カリウムを測定極3の電圧を掃引するこ

とにより酸化し、その時流れる酸化電流を測定する。この酸化電流は色素の変化電に比例し、色素が十分に存在すれば色素の変化量は基質濃度に対応するため、グルコースの濃度が検知できる。このグルコースセンサを用いると、400 μ g/dl という高濃度のグルコースが2分という短時間で測定できた。これは、従来例のように濾過して反応を行なわせるのではなく、まず、反応を行なわせる構成であり、高濃度の基質に充分対応できる酵素と色素がとけやすい状態で担持されているため短時間で反応が終了したと考えられる。さらに、反応層Bの上に血液と親和性の高いハイゼガーゼBを設置しているため、高粘度の血液でもすみやかに全面に広がり反応層Bに供給されるため、わずか15 μ l という微量な血液でも安定した応答電流が得られるようになった。ハイゼガーゼBのない場合は、血液が高粘度の場合反応層B上でのひろがりが悪く、反応液が電極部に達するのに1分近く必要とするものがあるが、ハイゼガーゼBを上を設置すると添加した血液は1秒以内に全面

面に広がるため、高粘度の血液でも微量のサンプルを有効に反応層へ供給することができた。さらに、多孔度の大きい不織布のため添加した血液が試料添加層Dで保持され反応層への供給が妨害されることもなかった。ハイゼガーゼの他にも、綿から作られた不織布、パルプの不織布なども使用できた。

実施例では、枠体10、11に反応層Bなどとともに試料添加層Dを組み込んだが、保液層E、濾過層F、反応層Bを枠体に組み込んだのち、試料保液層Dを落としこんで設置してもよい。

本発明のバイオセンサは、試料液以外の希釈液などは必要としないため、血液の添加量を15~100 μ l に変化させたところ、同一の血液では添加量に関係なく一定の値を示した。このため、添加量を正確にする必要がなく、微量の血液を添加するだけで簡易に測定が可能となった。さらに、高濃度の酵素および酸化型色素を用いることにより2分という短時間で反応が終了しているため、高温でインキュベートするための装置や蒸発を防

にひろがって反応層へ供給され、約30秒でほとんど血液サンプルの反応液が電極部に達した。反応層Bに界面活性剤を担持すると、血液のひろがり、浸透は改善されるが、界面活性剤の濃度によっては溶血がおこるため測定誤差が生じることがある。しかし、ハイゼガーゼBを用いることにより、反応層Bに界面活性剤を担持する必要がなくなり、溶血はみられず反応層中を血液が均一に浸透するため、再現性の良い応答が得られた。さらに、血液の添加の際、指に針をさして採血し直接測定する場合、反応層Bが直接指に触れると傷口に酵素や色素が溶解して汚染の危険性があるが、ハイゼガーゼBを設置することにより安全に血液の添加が可能となった。

試料添加層Dとして、実施例ではハイゼガーゼを用いた。この多孔体膜は、脱脂した綿の長繊維からなる不織布であり、高純度のセルロースのため、非常に血液に対して親和性が高い。また、長繊維を加工した不織布のため、添加した血液は直径5mmの面積であれば、1秒以内という早さで全

く防水層が不要で、簡易な装置および担体で精度よく測定できた。

色素としては、上記実施例に用いたフェリシアニ化カリウムが安定に反応するので適しているが、P-ベンゾキノンを使えば反応速度が早いので高速化に適している。又、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 β -ナフトキノロン4-スルホン酸カリウムなども使用できる。

なお、上記実施例におけるセンサはグルコースに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素としてはグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ等も用いられる。なお酵素は架橋剤等で固定化しても用いることができた。

発明の効果

このように本発明のバイオセンサによれば、直

微量なサンプルを滴下するだけで、特定成分を短時間に精度よく測定することができた。

4、図面の簡単な説明

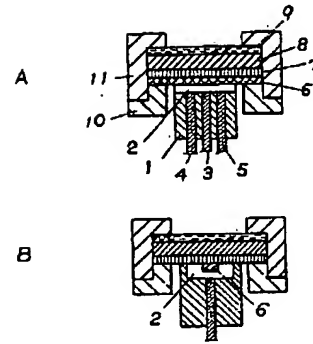
第1図A、Bは本発明の一実施例のグルコースセンサを直交した面で破断した断面模式図、第2図は従来のバイオセンサの模式図である。

1……基板、2……溝、3……測定極、4……対極、5……参照極、6……保液層、7……濾過層、8……反応層、9……試料添加層、10、11……枠体、12……支持体、13……試薬層、14……展開層、15……濾過層、16……防水層。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

- 1……基板
- 2……溝
- 3……測定極
- 4……対極
- 5……参照極
- 6……保液層
- 7……濾過層
- 8……反応層
- 9……試料添加層
- 10、11……枠体

第1図



第2図

